

豬瘟病毒 E2 醣蛋白免疫豬隻試驗

報告人：張家宜 助理研究員（豬瘟研究組）

壹、緒言

豬瘟乃引起高傳染性及致病性之豬隻重大疾病，主要以高熱及出血為特徵。豬瘟之病原為豬瘟病毒（Classical swine fever virus, CSFV），其分類於黃病毒科（Flaviviridae）中之瘟疫病毒屬（Pestivirus）。豬瘟病毒為二十面體、具有封套的顆粒，其直徑約為 40-50 nm。豬瘟病毒之基因體為單股正向的 RNA，大小約為 12.3 kb，含有一個 open reading frame (ORF)、5' 端及 3' 端的非轉譯區，其中 ORF 轉譯出的 polyprotein 經由蛋白酶切割為 4 個結構性蛋白（C、E^{ns}、E1 和 E2）和 8 個非結構性蛋白（N^{pro}、P⁷、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 及 NS5B）。在豬瘟病毒醣蛋白部份的研究顯示，E2 醣蛋白位在病毒表面，為主要誘發感染豬隻產生中和抗體的結構蛋白；而利用桿狀病毒表現系統感染昆蟲細胞所表現的 E2 蛋白可以有效保護豬隻不受豬瘟病毒的感染。在豬瘟病毒的基因分析方面，Paton 等人在 2000 年利用 5' 端的非轉譯區、E2 及 NS5B 的基因片段作豬瘟病毒的基因分析，可將豬瘟病毒分為三個基因型及十個亞型，分別為 1.1、1.2、1.3、2.1、2.2、2.3、3.1、3.2、3.3、3.4，其中台灣的 p97 及 94.4 本土型豬瘟病毒被歸類為 3.4 亞型，疫苗株則是歸類在 1.1 亞型。近年來針對台灣所分離之豬瘟病毒的序列分析研究發現，在 1996 年以後所流行之豬瘟病毒是以新入侵型為主，此新入侵型病毒為 2.1 亞型，在基因型上與過去流行之本土型 3.4 亞型及用於疫苗製造的 LPC 病毒株 1.1 亞型有差異性存在。由第二型病毒所引發之病毒間置換現象也同樣的可在歐洲及中國大陸觀察到此情形的發生，引發此置換現象之原因則需進一步研究探討。

貳、材料與方法

萃取 1.1、2.1 及 3.4 亞型豬瘟病毒核酸，設計具特異性之引子及限制酵素切割位進行 RT-PCR 反應增幅 E2 醣蛋白基因片段，並應用軟體分析三亞型豬瘟病毒之核酸與所轉譯出胺基酸序列之差異。將增幅出之 E2 醣蛋白基因片段選殖於桿狀病毒(baculovirus)載體，並將載體與線狀桿狀病毒 DNA 重組並轉染於昆蟲細胞內，收集並篩選重組之病毒。將重組之病毒分別感染昆蟲細胞增殖並測定感染病毒之力價。收集感染病毒之昆蟲細胞及培養液，萃取蛋白後進行蛋白質膠體電泳 (SDS/PAGE)，將電泳膠轉印到 NC membrane，之後進行西方墨點法(Western Blot)分析，並將重組病毒感染昆蟲細胞進行後間接螢光染色分析。將 1.1、2.1 及 3.4 亞型豬瘟病毒重組 E2 醣蛋白分別免疫豬隻，對照組則免疫 PBS。每次免疫相隔兩週，共免疫三次，並於免疫前採血。將採集之血液與豬瘟病毒進行交叉中和抗體試驗，測試抗體力價有無差異性。於第三次免疫後兩週進行攻毒試驗，以豬瘟病毒 ALD 強毒株攻毒，每天觀察臨床症狀及測量體溫，並每兩天採集血液，將採集之血

液進行病毒分離。

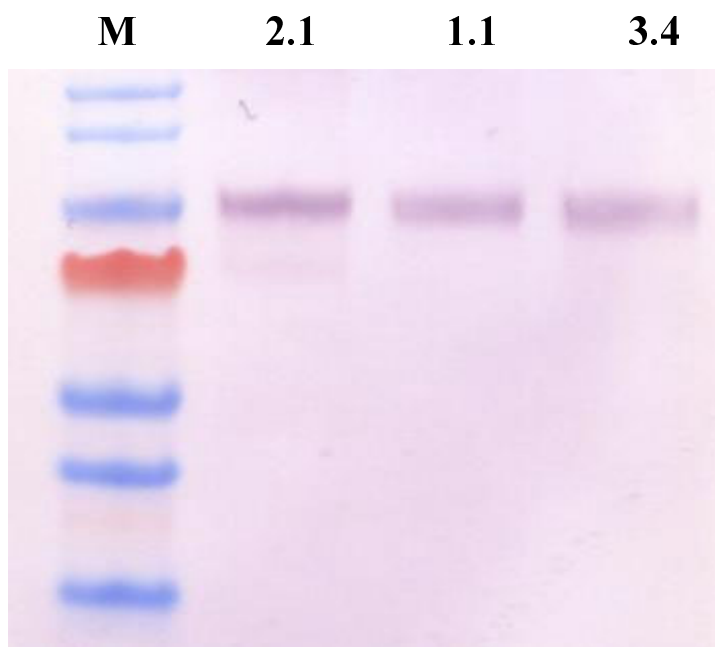
參、結果與討論

本實驗已成功的個別構築不同型別完整豬瘟病毒 E2 醣蛋白序列之載體，分析三亞型豬瘟病毒之核酸與所轉譯出胺基酸序列之結果顯示，三亞型其核酸相似度介於 82.5~83.8% 之間，而胺基酸相似度較高，介於 86.9~89.6%(表一)。為了能更正確表現 E2 醣蛋白之構型，故本實驗選用桿狀病毒之昆蟲細胞表現系統，並建立昆蟲細胞表現系統之模式。嵌入不同型豬瘟病毒 E2 醣蛋白之重組病毒測得之力價相似，皆介於 $10^{7.6} \sim 10^{8.1}$ TCID₅₀/ml 之間，顯示構築不同產物不會造成桿狀病毒力價之影響。本實驗表達之三亞型 E2 醣蛋白產物經由間接螢光染色法(圖一)及西方墨點法分析(圖二)皆可被豬瘟病毒抗體所辨認，且經西方墨點法在非還原狀態下，表現蛋白其分子量大小約 95 kDa 也與豬瘟病毒自然形成之 E2 醣蛋白 homodimer 相似，顯示昆蟲細胞表現之重組 E2 醣蛋白仍保有與自然感染豬瘟病毒產生之 E2 醣蛋白相似的抗原性。SPF 豬隻個別免疫 1.1、2.1 及 3.4 亞型豬瘟病毒重組 E2 醣蛋白之交叉中和抗體試驗結果顯示，第三次免疫後之血清其抗體力價對不同型豬瘟病毒間有明顯差異性及專一性，顯示有抗原性差異存在，但中和抗體力價最多不大於 64 倍，推測抗體力價不高原因可能與免疫重組蛋白之蛋白濃度不高有關，免疫純化濃縮之蛋白產物可能有助於中和抗體之提升。而以強毒株豬瘟病毒攻毒免疫豬隻之免疫保護試驗結果顯示，實驗豬隻並無臨床症狀產生，顯示本實驗表現之不同型豬瘟病毒重組 E2 醣蛋白除具有抗原性外，亦可誘發豬隻產生保護性中和抗體。惟免疫不同型重組 E2 醣蛋白豬隻皆有體溫上升之現象，且攻毒後之血液皆可分離到豬瘟病毒，顯示免疫重組 E2 醣蛋白不能完全抑制豬瘟病毒在豬隻體內之複製，此可能與豬隻產生之中和抗體力價不高有關。未來可嘗試將表現之重組 E2 醣蛋白免疫豬隻後，個別攻毒不同型之豬瘟病毒，以進一步分析不同型豬瘟病毒 E2 醣蛋白對於不同型病毒間之免疫性及抗原性。

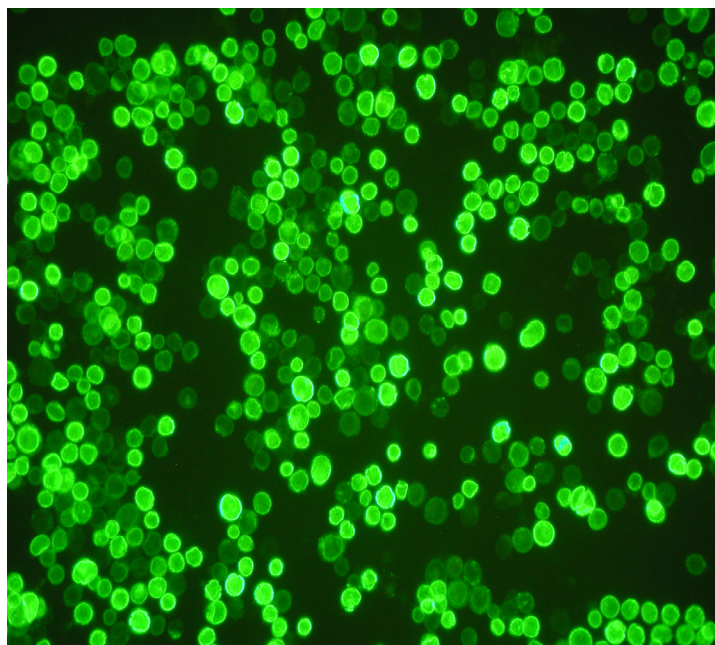
表 1. 三種亞型豬瘟病毒 E2 醣蛋白序列及胺基酸之比對

	2.1	3.4	1.1
2.1	-	82.5	83.8
3.4	89.6	-	83.7
1.1	87.4	86.9	-

註: 表格右上方為核酸序列之比對，左下方為胺基酸序列之比對



圖一、西方墨點法辨認重組 E2 醣蛋白



圖二、間接螢光染色法辨認重組 E2 醣蛋白